



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 1/20, A23C 9/123 // (C12N 1/20, C12R 1:225)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/16862</p> <p>(43) 国際公開日 1999年4月8日(08.04.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00481</p> <p>(22) 国際出願日 1998年2月5日(05.02.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/277949 1997年9月26日(26.09.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) カルピス株式会社(CALPIS CO., LTD.)[JP/JP] 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山本直之(YAMAMOTO, Naoyuki)[JP/JP] 河上夏江(KAWAKAMI, Natsue)[JP/JP] 石田 優(ISHIDA, Yuu)[JP/JP] 屋田裕一(YADA, Hirokazu)[JP/JP] 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピス株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 酒井 一(SAKAI, Hajime) 〒102-0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地 秀和紀尾井町TBRビル Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: LACTOBACILLUS HELVETICUS BACTERIUM HAVING HIGH CAPABILITY OF PRODUCING TRIPEPTIDE, FERMENTED MILK PRODUCT, AND PROCESS FOR PREPARING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 トリペプチド高生産性ラクトバチルス・ヘルベチカス乳酸菌及び発酵乳製品及びその製造法</p> <p>(57) Abstract A strain of a lactic bacterium capable of producing a large amount of lactotripeptide; and a fermented milk product which contains a number of components having hypotensive and stress relaxation activities and can be easily eaten and swallowed. More specifically a lactic bacterium belonging to the genus Lactobacillus helveticus, i.e. Lactobacillus helveticus strain CM4 (deposited under the accession number of FERM PB-6060 with National Institute of Bioscience and Human-Technology), which is characterized by having particular mycological properties, producing tripeptides Val-Pro-Pro and/or Ile-Pro-Pro in an amount of not less than 60 µg/ml in terms of Val-Pro-Pro when cultured in animal milk as the medium, containing not less than 9 % by weight (in terms of solid content) of non-fat milk, and exhibiting an extracellular protease activity of not less than 400 U/OD<sub>590</sub>; and a fermented milk product prepared by fermenting animal milk with the above lactic bacterium.</p>		

(57)要約

ラクトリペプチドを大量に産生しうる乳酸菌株及び血圧降下活性及びストレス緩和作用を有する成分を多く含み、かつ飲食に供しやすい発酵乳製品を提供する。特定の菌学的性質を有し、無脂乳固形分を9重量%以上含む獣乳を培地として培養した際に、培養液中にトリペプチドVal-Pro-Pro及び／又はIle-Pro-Proを、Val-Pro-Pro換算量で60  $\mu$ g/ml以上生産し、且つ菌体外プロティナーゼ活性400 U/OD<sub>590</sub>以上を示すことを特徴とするラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌、ラクトバチルス・ヘルベチカスCM4株（工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号：FERM BP-6060）、及び獣乳をこれら乳酸菌を用いて発酵させて得た発酵乳製品。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア				

## 明 細 書

トリペプチド高生産性ラクトバチルス・ヘルベチカス乳酸菌及び発酵乳製品及びその製造法

技術分野

本発明は、獣乳培地中において培養した際に、特定のトリペプチドを高効率で産生することができ、かつ菌体外プロテイナーゼ活性が高い新規なラクトバチルス・ヘルベチカス(*Lactobacillus helveticus*)に属する乳酸菌、該乳酸菌を含む発酵乳製品及びその製造法に関する。

背景技術

ラクトバチルス・ヘルベチカスは、古くから代表的な酪農乳製品用乳酸菌スターターとして、発酵乳等の製造に用いられている。ラクトバチルス・ヘルベチカスは強い蛋白分解活性を有し、特に高い活性を有する菌体外プロテイナーゼは、獣乳の発酵性に対して重要な働きをする。即ち、菌体外プロテイナーゼは獣乳蛋白質を分解し各種のペプチド断片を生成する。生成されたペプチドはペプチダーゼ群の作用を受けて、さらに低分子のペプチドになる。蛋白質分解酵素群の作用により培地中に生成したペプチドの一部は、乳酸菌菌体内へ取り込まれて、窒素源として利用されることが知られている。一方、培地中に生成したペプチドには、血圧上昇作用の原因物質であるアンギオテンシン変換酵素(Angiotensin Converting Enzyme、以下ACEと称す)に対して阻害活性を有するものが存在することが報告されている(J. Dairy Sci. 78:777-783(1995))。

ACEの酵素活性を阻害し、血圧上昇を抑制することを目的としたペプチドについては、既に乳蛋白質、大豆蛋白質又は魚肉蛋白質分解物等から、多くの種類の有効ペプチドが報告されている。例えば、ラ

クトバチルス・ヘルベチカス発酵乳中のACE阻害活性を有するペプチドとして、Val-Pro-Pro及びIle-Pro-Pro（以下、それぞれVPP及びIPPと略す。またこれらを合わせてラクトリペプチドと称す。）が知られている。更にこれらラクトリペプチドは強い血圧降下作用を有することが自然発症高血圧ラット（SHR）を用いた実験により確認されている（J. Dairy Sci.78:1253-1257(1995)）。

しかしながら、獣乳等を従来のクトバチルス・ヘルベチカス株により発酵させて得たラクトリペプチド含有発酵乳は、発酵の進行に従い多量に生成される乳酸に起因して高い酸度を示すため、直接飲食することは困難であり、希釈することによってラクトリペプチド含有割合が極端に減少するという問題がある。

そこで、生成乳酸量に対するラクトリペプチドの含有割合が高い発酵乳を製造することができれば、各種の飲食品へ発酵乳を少量配合することによっても、ラクトリペプチドに起因する機能性を維持したまま飲食しやすい形態の製品を簡便に製造し消費者へ提供することが可能になる。しかしながら、ラクトリペプチドを高い割合で産生する乳酸菌株については知られていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、生成乳酸量に対して高効率でラクトリペプチドを大量に生産しうる新規な乳酸菌株を提供することにある。

本発明の別の目的は、血圧降下活性等の機能を有し、ストレス緩和作用が期待されるラクトリペプチドと、このラクトリペプチドを大量に生産しうる乳酸菌株を含み、飲食に供し易い発酵乳製品及びその製造法を提供することにある。

本発明によれば、以下の菌学的性質を有し、無脂乳固形分を9重量

%含む獣乳を培地として培養した際に、培養液中にトリペプチドVal-Pro-Pro及びIle-Pro-Proを、Val-Pro-Pro換算量で $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上生産し、且つ菌体外プロテイナーゼ活性 $400\text{U}/\text{OD}_{590}$ 以上を示すラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌が提供される。

#### 形態学的性質

- 1) 細胞の形状；桿菌
- 2) 運動性；なし
- 3) 胞子の有無；なし
- 4) グラム染色性；陽性

#### 生理学的性質

- 1) カタラーゼ；陰性
- 2) インドール生成；陰性
- 3) 硝酸塩の還元；陰性
- 4) 酸素に対する態度；通性嫌気性菌
- 5) グルコースによりホモ乳酸発酵によりDL-乳酸を生成し、

ガスの産生はない；

- 6) 各種炭水化物の分解性

グルコース；＋

ラクトース；＋

マンノース；＋

フラクトース；＋

ガラクトース；＋

シュークロース；－

マルトース；－

キシロース；－

ラムノース；－  
セルビオース；－  
トレハロース；－  
メルビオース；－  
ラフィノース；－  
スタキオース；－  
マンニトール；－  
ソルビトール；－  
ユースクリン；－  
サリシン；－

また本発明によれば、前記ラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌であって、ラクトバチルス・ヘルベチカスCM4株（工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号：FERM BP-6060，寄託日1997.8.15）であるラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌が提供される。

更に本発明によれば、前記ラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌であって、制限酵素Pst I及びEcoRIによって切断すると、15～17kbのDNA断片を生じる染色体DNAを有するラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌が提供される。

また本発明によれば、前記乳酸菌と、Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro及びこれらの混合物からなる群より選択されるトリペプチドとを含む発酵乳を含有する発酵乳製品が提供される。

更に本発明によれば、Val-Pro-Pro及びIle-Pro-Proの配列を含むペプチド、タンパク質及びこれらの混合物からなる群より選択される食品素材を含む培地を、前記乳酸菌により発酵させる工程を含む発酵乳

製品の製造法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 2 における、各種ラクトバチルス・ヘルベチカス株の染色体 DNA の断片のアガロースゲル電気泳動による分析結果を示す写真である。

#### 発明の好ましい実施の態様

本発明の乳酸菌は、ラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌であり、無脂乳固形分を 9 重量%含む獣乳を培地として培養した際に、培養液中にトリペプチド VPP 及び IPP を、VPP 換算量で  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上、好ましくは  $70 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上生産し、且つ菌体外プロテイナーゼ活性  $400 \text{U}/\text{OD}_{590}$  以上、好ましくは  $430 \text{U}/\text{OD}_{590}$  以上を示すことを特徴とする。このラクトトリペプチドの生産性の規定は、従来のラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌と本発明の乳酸菌とを区別するためのパラメーターであって、例えば、無脂乳固形分 9 重量%を含む獣乳を用いた場合には、従来の乳酸菌では得られない VPP 換算量で  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上のラクトトリペプチドが得られるという本発明の乳酸菌の特性を規定したものである。従って、通常、培養する培地中の無脂乳固形分の含有割合が少なくなればラクトトリペプチドの生産量も少なくなり、逆に多くなれば多くなるものである。

前記パラメーターとして用いるラクトトリペプチドの生産性は、無脂乳固形分 9 重量%を含む獣乳、例えば牛乳、山羊乳、馬乳又はこれらの脱脂乳等に乳酸菌を接種後、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した発酵乳を  $1 \text{ml}$  とり、そのまま  $15,000 \text{rpm}$  で 10 分間遠心分離して得た上清中の VPP 及び IPP 量を測定し、VPP 量に換算した値であ

る。換算は、I P Pの重量当りのA C E阻害活性がV P Pの1.7倍であることから、以下の式によりV P P換算量が求められる。

$$\text{ラクトトリペプチド換算量(V P P換算 } \mu\text{g/ml)} = \text{I P P量}(\mu\text{g/ml}) \times 1.7 + \text{V P P量}(\mu\text{g/ml})$$

ラクトトリペプチドの生産量の上限は特に限定されないが、培地中の蛋白質に含まれる全てのVal-Pro-Pro及びIle-Pro-Proの配列がトリペプチドとして切り出された際の量が上限となる。

前記菌体外プロティナーゼ活性は、Twiningらの方法(Twining, S. A. *Anal. Biochem.* 143 3410 (1984))をもとにしたYamamotoらの方法(Yamamoto, N.ら *J. Biochem.* (1993) 114, 740)に従った反応条件において、1%の蛍光強度を生じる酵素量を1 U / OD<sub>590</sub>とした場合の値である。この菌体外プロティナーゼ活性の上限も特に限定されないが、通常は800 U / OD<sub>590</sub>である。

本発明の乳酸菌は、発酵に際して生成される乳酸量の割合に対してラクトトリペプチドの生産割合が多いため、従来の乳酸菌で発酵させた際と同様な乳酸量に対してラクトトリペプチドを多く含む発酵乳を得ることができる。このような発酵に由来する乳酸はDL-乳酸であって、本発明の乳酸菌による発酵において生成するDL-乳酸の量に対するラクトトリペプチドの生産割合は、得られる発酵乳1 mlあたり、DL-乳酸0.01 gに対し、ラクトトリペプチドがV P P換算量で30  $\mu$ g以上生産されるのが好ましい。またラクトトリペプチド生産量の上限は特に限定されないが、得られる発酵乳1 mlあたり、DL-乳酸0.01 gに対しV P P換算量で50  $\mu$ g程度まで生産することが可能である。この生成するDL-乳酸量とラクトトリペプチド生産量との関係は略比例関係になる。従って、例えば、得られる発酵乳1 ml



中のDL-乳酸の生成量が0.02gである場合には、ラクトトリペプチドの生産量は、VPP換算量で60 $\mu$ g以上となる生産量が好ましい。これに対し、従来のラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌による発酵では、得られる発酵乳1mlあたり、DL-乳酸0.01gに対して、ラクトトリペプチドは、好ましくてもVPP換算量で30 $\mu$ g/ml未満得られるに過ぎない。

本発明の乳酸菌の一例として、ラクトバチルス・ヘルベチカスCM4株が工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号：FERM BP-6060(寄託日1997.8.15)として寄託されている。ラクトバチルス・ヘルベチカスCM4株は、以下に示す菌学的性質を有する。

菌学的性質：

1. 形態学的性質

- 1) 細胞の形状；桿菌
- 2) 運動性；なし
- 3) 胞子の有無；なし
- 4) グラム染色性；陽性

2. 生理学的性質

- 1) カタラーゼ；陰性
- 2) インドール生成；陰性
- 3) 硝酸塩の還元；陰性
- 4) 酸素に対する態度；通性嫌気性菌
- 5) グルコースによりホモ乳酸発酵によりDL-乳酸を生成し、

ガスの産生はない。

6) 各種炭水化物の分解性

グルコース；+

ラクトース；＋  
マンノース；＋  
フラクトース；＋  
ガラクトース；＋  
シュクロース；－  
マルトース；－  
キシロース；－  
ラムノース；－  
セルビオース；－  
トレハロース；－  
メルビオース；－  
ラフィノース；－  
スタキオース；－  
マンニトール；－  
ソルビトール；－  
ユースクリン；－  
サリシン；－

以上の菌学的性質を光岡らの方法(臨床検査18、1163(1974))により  
同定すると公知株ラクトバチルス・ヘルペチカスNCD0-099と同一であ  
る。但し、光岡らの方法に記載されていない下記の性質については明  
らかにNCD0-099とは異なっている。

- 7) 菌体外プロテイナーゼ活性；400 U / OD<sub>590</sub>以上の活性
- 8) ラクトトリペプチド生産性；9重量%脱脂乳を用い37℃で2  
4時間培養した発酵液中に2種のトリペプチド(VPP及び  
IPP)を、VPP換算量で60 µg / ml以上生産する

なお、8)のラクトトリペプチド生産性は、無脂乳固形分として脱脂乳を用いて測定した値である。

本発明の乳酸菌株は、例えば以下に示すスクリーニング方法及び菌隊がいプロティナーゼ活性の測定により得ることができる。

#### (1) 一次スクリーニング

(ACE阻害活性の高い発酵乳の選択)

9重量%脱脂乳培地を用いてスクリーニング株を37℃、24時間培養する。培養終了後に乳酸菌数、乳酸酸度、ACE阻害活性を測定する。乳酸菌数 $1 \times 10^8$ 個/ml以上、乳酸酸度1.6重量%以上、ACE阻害活性40ユニット/ml以上の菌株を選択する。なお、ACE阻害活性は、CushmanとCheungの方法(Cushman, D.W. and Cheung, H.S. Pharmacol., 20 1637(1971))に基づいて測定する。

#### (2) 二次スクリーニング

(ラクトトリペプチド高生産性株の選択)

一次スクリーニングにより選択された菌株の培養液を遠心分離機にて15,000rpm、10分間処理後の上清を用いて、HPLCによりラクトトリペプチドの定量分析を行う。ラクトトリペプチド含量(VPP換算量)50 $\mu$ g/ml以上の菌株を選択する。

#### (3) 菌体外プロティナーゼ活性の測定

二次スクリーニングにより選択された菌株を9重量%脱脂乳培地中でpH6に維持しながら培養して、対数増殖期中期でサンプリング後に、クエン酸ナトリウムを1重量%になるように添加し、5,000rpm、10分間の遠心分離を行い菌体を回収する。次いで、50mM $\beta$ -グリセロリン酸にて菌体を洗浄後に、菌体を50mMトリス塩酸(pH7.8)緩衝液に懸濁して、濁度(OD<sub>590</sub>)1に調整し菌体

表面のプロテイナーゼ活性を測定する。測定結果は、二次スクリーニングにおいて選択されるラクトトリペプチド高生産株と関連することが確認できる。

以上の方法により選択されたラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌株と他の乳酸菌株との識別は、前記ラクトトリペプチド生産性、菌体外プロテイナーゼ活性等から同定することができる。

本発明の乳酸菌は、前記ラクトトリペプチド生産性、菌体外プロテイナーゼ活性を有する他、好ましくは制限酵素 *Pst*I 及び *Eco*R I によって切断すると、15～17 kb の DNA 断片を生じる染色体 DNA を有する。従って、このような DNA 断片を生じる染色体 DNA を有するか否かを測定することによって、同種に属する他の菌株とより明確に識別することができる。

前記 15～17 kb の DNA 断片の測定は、具体的には、乳酸菌の染色体 DNA を Leenhouts らの方法 (Leenhouts, K. (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56:2726) で抽出し、*Eco*R I と *Pst*I による切断を行い、0.8% のアガロースゲル電気泳動し、その泳動パターンの分析により行うことができる。その際、DNA のサイズマーカーとして、 $\lambda$  ファージ DNA の制限酵素 *Hind* III 分解物等を平行して泳動することにより、明確にその存在が確認できる。

本発明の発酵乳製品は、前記乳酸菌と、VPP、IPP 及びこれらの混合物からなる群より選択されるトリペプチドとを含む発酵乳を必須の構成成分として含有する。即ち、VPP 及び IPP の配列を含むペプチド及び／又はタンパク質からなる食品素材を含む培地を、前記本発明の乳酸菌により発酵させて得た、ラクトトリペプチドと前記乳酸菌とを含む発酵乳を含有するものであれば良い。従って、乳酸菌と、

トリペプチドとの含有割合は発酵乳製品の種類に応じて適宜選択することができ、発酵物をそのまま含有させたもの、希釈して含有させたもの、更には精製して含有させたものでも良い。

本発明の発酵乳製品は、発酵に由来するDL-乳酸を含む。本発明の発酵乳製品は、このDL-乳酸0.01gに対して、ラクトトリペプチドをVPP換算量で30～50 $\mu$ gの範囲含むのが好ましい。このDL-乳酸量とラクトトリペプチド量との関係は略比例関係になる。従って、発酵乳製品中に含まれる発酵乳が濃縮されたものである場合には、例えば、発酵乳製品中のDL-乳酸量が0.02gである場合、ラクトトリペプチド量は、VPP換算量で60～100 $\mu$ gの範囲が好ましい。逆に希釈された発酵乳を用いた場合には、例えば、発酵乳製品中のDL-乳酸量が0.005gである場合、ラクトトリペプチド量は、VPP換算量で15～25 $\mu$ gの範囲が好ましい。なお、本発明の発酵乳製品には、酸度を調整するために食品添加物として使用されるL-乳酸を添加することができるが、このL-乳酸と、前記発酵に由来するDL-乳酸は区別されるものである。

本発明の発酵乳製品中の乳酸菌は、発酵終了後に殺菌されたものであっても殺菌せずに生きた菌のものでもいずれでも良い。

本発明の発酵乳製品としては、ヨーグルト、乳性乳酸菌飲料、チーズ、酸乳配合の加工食品、酸乳配合の健康食品等が挙げられる。従って、本発明の発酵乳製品は、必須の構成成分としての前記発酵乳の他に、これらの製品とするために通常配合される各種材料を適宜配合することができる。本発明の発酵乳製品の形態としては、粉末状、顆粒状、錠剤等の固体；ペースト状、ゲル状、液状等の流体のいずれであっても良い。

## 1 2

本発明の発酵乳製品の製造法は、V P P 及び I P P を構成単位として含むペプチド、タンパク質及びこれらの混合物からなる群より選択される食品素材を含む培地を、前記乳酸菌により発酵させる工程を含む。

前記培地に含有させる食品素材としては、V P P 及び I P P を構成単位として含むペプチド及び／又はタンパク質を含むものであれば良く、例えば、獣乳、乳カゼイン、トウモロコシ、コーン蛋白、小麦、小麦蛋白、大豆、豆乳、脱脂大豆、大豆蛋白又はこれらの混合物等が挙げられる。特に、牛乳、山羊乳、馬乳又はこれらの脱脂乳等の獣乳を含有した食品素材の使用が好ましい。獣乳を用いる場合の無脂乳固形分の含有割合は特に限定されないが、通常、5～20重量%である。

前記乳酸菌を培地に接種する際の接種量は特に限定されないが、通常、培地中の前記特定の食品素材1g当り乳酸菌数 $10^5 \sim 10^7$ 個程度である。

前記発酵の条件としては、発酵温度は25～50℃、好ましくは30～45℃であり、発酵時間は6～30時間、好ましくは10～24時間である。pH条件は、好ましくはpH3.0～4.0、特に好ましくはpH3.0～3.5の範囲である。

前記発酵は、好ましくは、得られる発酵乳中のラクトトリペプチド量がV P P 換算量で60 $\mu$ g/ml以上となるよう行うことが好ましい。具体的には例えば培地として無脂乳固形分9重量%の牛乳を使用した場合、25～40℃で12～48時間発酵させることにより、ラクトトリペプチド量をV P P 換算量で70 $\mu$ g/ml以上含有する発酵乳が得られる。但し、培地中の無脂乳固形分の割合と生産されるラクトトリペプチド量とは略比例関係にあり、例えば無脂乳固形分5重

## 1 3

量%の食品素材を使用した場合、V P P換算量で約33.3  $\mu\text{g}/\text{m}$ 以上、1以上のラクトトリペプチドを、前記発酵の条件により得ることができる。

前記発酵により得られた発酵乳は、必要に応じて希釈、精製したり、若しくはそのまま製品に含有させることができるが、必要に応じ約5℃に冷却し保存した後、他の成分との配合などを行い、チルド商品等の製品とすることもできる。また、加熱殺菌処理等を行い、必要に応じて噴霧乾燥等により粉末化して常温流通商品とすることもできる。

本発明の発酵乳製品においては、前記乳酸菌による発酵により得られる発酵乳を含有するので、乳酸量に対するラクトトリペプチド含有割合が高く、飲食に供し易い製品を簡便に製造することができ、しかもヒトに摂取させることによって、ラクトトリペプチドに起因する血圧降下作用、抗ストレス作用等の発現が期待できる。

本発明の乳酸菌は、特定の食品素材を培地として培養することによりラクトトリペプチドを大量に産生することができるので、ラクトトリペプチドに起因する血圧降下活性、ストレス緩和作用等を示す各種発酵乳製品、機能性食品、健康食品、特定保健用食品、高齢者用の特別用途食品又はこれらの材料の生産に有効である。

### 実施例

以下実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

なお、実施例中のラクトバチルス・ヘルベティカス株のうち、CM4株は工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号：FERM BP-6060として寄託されており、ATCC15009、NCD0-099、JCM1006、ATCC10797、JCM1062、JCM1103、JCM1120及びJCM1004は公知株である。実施例中の

これ以外の株は、出願人が保有する菌株コレクションより選択されたものである。

### 実施例 1

(ACE阻害活性の高い発酵乳を与える菌株の選択)

各種酪農製品から分離されたラクトバチルス・ヘルベチカス36株について、その発酵乳のACE阻害活性を以下の方法で調べた。各ラクトバチルス・ヘルベチカス株を9重量%脱脂粉乳培地で37℃、24時間培養し、新しい同培地に3重量%添加し、さらに37℃、24時間培養した。発酵終了後、乳酸酸度(重量%)、ホエー内のペプチド量(mg/ml)、菌数及びACE阻害活性(U/ml)を測定した。結果を表1に示す。36株中7株については発酵性が極めて弱かった。乳酸酸度生成量が1.6重量%以上のものは15株であり、その中から発酵乳内ホエーのACE阻害活性が40 U/ml以上のものの8株を選択した。

(発酵乳内ACE阻害活性の測定法)

ACE阻害活性の測定は、CushmanとCheungの方法(Cushman, D.W. and Cheung, H.S. Pharmacol., 20 1637(1971))に基づいて行った。即ち、各種発酵乳を15,000rpm、5分間の遠心により上清(ホエー)を調製した。そのホエーを、測定可能な倍率に適宜希釈した後、その80μlを試験管に移し、次に基質として0.1Mホウ酸緩衝液(0.3M NaClを含む、pH7.3)で5mMに調製したヒプリル・ヒスチジン・ロイシン(Hip-His-Leu、シグマ社製)0.2mlを加えて、さらに酵素溶液(0.1 U/ml、シグマ社製)20μlを添加して37℃で30分間反応させた。その後、1N塩酸を250μl加えて反応を停止させた後、1.7mlの酢酸エチルを加えて約



20秒間攪拌した。次いで3,000rpmで10分間遠心分離し、酢酸エチル層（上層）1.4mlを回収し、120℃で40分間加熱し、溶媒を除去した。溶媒除去後、蒸留水1mlを加えて、約20秒間攪拌し抽出されたヒプリル酸の228nmにおける吸収の値を測定した。酵素活性ユニットはACE活性の50%阻害を与える量を1ユニットとして、下記式により算出した。

$$\text{酵素量(ユニット)} = ((A - B) / (A - C)) \times 100 \times 1 / 50$$

A：試料を含まない場合の228nmの吸光度

B：試料を添加した場合の228nmの吸光度

C：酵素及び試料を添加しない場合の228nmの吸光度

（発酵乳内ペプチド量の定量法）

ペプチドの定量はOPA法（Charch, F.C.らJ.Dairy.Sci. 66 1219(1983)）により行った。検量線の作成には、標準物質として、カゼインのトリプシン分解物を用いた。

表 1

菌株	酸度 (重量%)	ペプチド量 (mg/ml)	菌数 ( $\times 10^8$ 個細胞/ml)	A C E 阻害活性 (U/ml)
分離株 1	-	-	-	-
分離株 2	-	-	-	-
分離株 3	-	-	-	-
分離株 4	-	-	-	-
分離株 5	-	-	-	-
分離株 6	-	-	-	-
分離株 7	-	-	-	-
分離株 8	0.498	1.59	0.29	26.4
分離株 9	2.022	1.99	9.53	34.5
分離株 10	1.709	2.10	8.53	24.5
分離株 11	0.615	1.76	1.28	29.1
分離株 12	0.411	1.35	0.38	17.6
分離株 13	0.917	1.57	3.63	19.9
分離株 14	1.026	1.71	5.78	9.4
分離株 15	0.517	1.59	0.56	26.9
分離株 16	1.532	4.69	5.97	102.5
分離株 17	2.101	2.01	6.09	98.9
分離株 18	1.783	1.94	5.38	21.9
分離株 19	1.955	1.69	5.31	100.6
分離株 20	2.095	1.74	7.16	61.4
分離株 21	1.963	2.03	6.05	125.3
分離株 22	1.798	2.85	6.19	54.2
分離株 23	1.604	2.32	6.81	36.6
分離株 24	1.932	1.77	7.97	47.7
分離株 25	1.885	1.51	4.91	18.3
分離株 26	1.862	1.46	5.69	26.2
分離株 27	1.063	3.01	2.78	76.9
分離株 28	0.457	1.98	0.50	52.4
分離株 29	0.516	2.55	1.13	92.6
JCM1006	1.872	2.35	6.97	48.5
JCM1062	1.109	2.60	8.50	78.4
JCM1103	1.244	1.36	3.69	31.0
ATCC10797	1.359	2.11	8.56	13.8
ATCC15009	1.454	1.81	5.16	16.6
NCDO-099	1.769	2.76	6.59	25.5
CM4	1.635	3.12	4.44	130.0

(ラクトトリペプチド生産性の高い菌株の選択)

続いて、上記 A C E 阻害活性の高い発酵乳使用菌株 8 株について、  
発酵乳内の V P P 及び I P P を測定した。

発酵乳 1 m l を、そのまま 15, 000 r p m で 10 分間遠心分離

し、その上清即ちホエーを回収した。このホエー 0.3 ml を Sep-Pak Cartridge (ウォーターズ社製) に吸着させ、蒸留水で洗浄した。メタノール 5 ml で溶出し、遠心処理下で減圧、乾燥させた。乾燥物を 0.3 ml の 0.05% トリフルオロ酢酸の水溶液に溶解し、以下の条件で HPLC (高速液体クロマトグラフィー) 分析した。結果を表 2 に示す。

使用機種：

日立 L4000 UV デテクター (215 nm で検出)

L6200 インテリジェントポンプ

L5030 カラムオーヴン (35℃)

分離条件：流速 0.5 ml / 分

溶離液：0.3 M NaCl、0.05% トリフルオロ酢酸の水溶液

カラム：Asahipak GS320 (Φ3.9×600mm)

IPP の重量当りの ACE 阻害活性は VPP の 1.7 倍であることから、IPP 量及び VPP 量からラクトトリペプチドを以下の式により VPP 換算量として求めた。結果を表 2 に示す。

ラクトトリペプチド換算量 (VPP 換算  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = IPP 量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $\times$  1.7 + VPP 量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

表 2

菌株	ペプチド量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ホエー)			酸度 (重量%)
	VPP	IPP	VPP換算ラクト トリペプチド量	
分離株17	15.2	11.1	34.0	1.5
分離株19	11.2	7.3	23.7	1.4
分離株20	13.0	8.1	26.8	1.6
分離株21	16.6	11.4	36.0	1.6
分離株22	15.8	12.1	36.3	1.5
分離株24	12.6	8.7	27.4	1.6
JCM1006	12.9	9.3	28.6	1.3
CM4	38.5	23.5	78.5	1.9

ラクトトリペプチドのVPP換算量は、CM4株発酵乳のもので最も高く、 $78.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ホエーであった。それ以外の7株の平均値は $34.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ホエーであった。

(菌体外プロティナーゼ活性の測定)

表1に示しす発酵性についての試験結果が比較的良好であった株16株の菌体外プロティナーゼを、Twiningらの方法(Twining, S. Anal. Biochem. 143 3410 (1984))をもとにしたYamamotoらの方法(Yamamoto, N.ら J. Biochem. (1993) 114, 740)に従って行った。即ち、各種菌株を9重量%脱脂粉乳中でpHを6.0に維持して培養し、対数増殖期中期で集菌した。クエン酸ナトリウムを終濃度1%になるように添加し、乳培地を透明化し、 $5,000 \text{ rpm}$ で10分間の遠心分離を行い菌体を回収した。次に、 $50 \text{ mM}$   $\beta$ -グリセロリン酸により菌体を洗浄後、菌体を $50 \text{ mM}$ のトリス塩酸pH7.8の緩衝液に懸濁し濁度( $\text{OD}_{590}$ 即ち $590 \text{ nm}$ の吸収で測定)を1に合わせた。 $0.4\%$ のフルオレセイン-カゼイン(シグマ社製) $20 \mu\text{l}$ に菌体懸濁液 $30 \mu\text{l}$ を加え $42^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートし、 $5\%$ トリクロロ酢酸を $120 \mu\text{l}$ 加え室温にて約20分間放置し、 $15,000$ 回転で10分間の遠心分離を行った。上清 $60 \mu\text{l}$ を $3 \text{ ml}$ の $500 \text{ mM}$ トリス塩酸pH8.3に加え、蛍光強度を測定した。蛍光強度は励起波長 $490 \text{ nm}$ で生じる $525 \text{ nm}$ の蛍光を測定した。活性は上記反応条件で、 $1\%$ の蛍光強度を生じる酵素量を1ユニットと定義し、それぞれの菌体外プロティナーゼのユニット数を求めた。結果を表3に示す。

表 3

菌株	U / O D <sub>590</sub>
分離株17	136.7
分離株18	102.8
分離株19	103.2
分離株20	89.9
分離株21	80.1
分離株22	243.3
分離株23	116.6
分離株24	116.6
分離株25	192.6
分離株26	108.4
JCM1006	185.7
JCM1062	96.5
JCM1103	176.3
ATCC15009	168.1
ATCC10797	106.5
NCD0-099	229.7
CM4	452.6

ラクトバチルス・ヘルベチカスCM4株の活性が最も高く450 U / O D<sub>590</sub>であった。一方、その他の16株の活性平均値は141 U / O D<sub>590</sub>とCM4株に比べ約3分の1程度であった。

### 実施例 2

実施例1で選択したラクトバチルス・ヘルベチカス36株の中から選択した11株について、染色体DNAをLeenhoutsらの方法(Leenhouts, K. (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56:2726)で抽出し、いくつかの制限酵素による切断を行い0.8%のアガロースゲル電気泳動し、その泳動パターンの分析を行った。

その結果、E c o R I と P s t I とにより切断したDNA断片についてCM4株の染色体について特徴的DNA断片が認められた(図1中矢印1)。CM4以外の菌株の染色体にはこの断片は認められず、ほとんどの株でそれより短い断片が認められた(図1中矢印2)。ここでDNAのサイズマーカーとしてλファージDNAの制限酵素H i

## 20

nd III 分解物（移動度の低いものから 23.1 kb、9.4 kb、6.6 kb、4.4 kb、2.3 kb 及び 2.0 kb）を同時に電気泳動し、特徴的断片の分子量を測定したところ約 16 kb であった。従って、CM4 株は EcoRI と PstI とによる切断によって、分子量約 16 kb の DNA 断片を生じる染色体 DNA を有することが確認された。また、CM4 株以外の他の株は、それぞれ共通して分子量約 13 kb の DNA 断片を生じる染色体 DNA を有することが確認された。

### 実施例 3

実施例 1 で選択されたラクトバチルス・ヘルベチカス CM4 株を用いて発酵乳の製造を行った。CM4 株を 9 重量%脱脂乳 100 g を用いて 37℃、12 時間培養したものを、新しい同培地 3 kg に接種し、37℃、12 時間培養した。培養終了した発酵乳全量をスターター（CM4 株の菌数  $6.3 \times 10^8$  個/ml）として用い、9 重量%脱脂乳 100 kg を 32℃、20 時間発酵させた。発酵終了時の発酵乳中には、ラクトトリペプチドが  $74.8 \mu\text{g/ml}$  含まれていた。また、乳酸量は 1.9 重量%であった。

得られた発酵乳 43 kg にグラニュー糖 4 kg、水 3 kg、ハイメトキシペクチン 0.15 kg を加えた後に均質化して、ドリンクヨーグルト 50 kg を得た。このドリンクヨーグルトはマイルドな好ましい風味を有し、pH 3.6 で、CM4 の生菌数は  $4.6 \times 10^8$  個/g であった。

### 実施例 4

実施例 3 で得られた発酵乳 26.5 kg にグラニュー糖 45.0 kg、ハイマルトース液糖 4.7 kg、水 13.8 kg を加えて、攪拌しながら 3 重量%ハイメトキシペクチン溶液 10 kg を加えた。得ら

## 21

れた混合液をラボラトリーホモゲナイザー（マントンゴーリン社製、形式15M-8BA）を用いて、処理圧力150 kg/cm<sup>2</sup>、処理流量2500 ml/分で均質化処理を行った。均質化処理液にバニラ系香料を加えて85℃達温殺菌を行った。殺菌処理発酵乳を200 l用ガラス壺に熟時充填した。得られた殺菌処理発酵乳製品中のラクトトリペプチド量を測定したところ、殺菌前の発酵乳配合量中に含まれるラクトトリペプチド相当量が含まれていた。また乳酸量は0.5重量%であった。

## 請 求 の 範 囲

- 1) 以下の菌学的性質を有し、無脂乳固形分を9重量%含む獣乳を培地として培養した際に、培養液中にトリペプチドVal-Pro-Pro及びIle-Pro-Proを、Val-Pro-Pro換算量で $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上生産し、且つ菌体外プロテイナーゼ活性 $400\text{U}/\text{OD}_{590}$ 以上を示すラクトバチルス・ヘルペチカスに属する乳酸菌：

## 形態学的性質

- 1) 細胞の形状；桿菌
- 2) 運動性；なし
- 3) 孢子の有無；なし
- 4) グラム染色性；陽性

## 生理学的性質

- 1) カタラーゼ；陰性
- 2) インドール生成；陰性
- 3) 硝酸塩の還元；陰性
- 4) 酸素に対する態度；通性嫌気性菌
- 5) グルコースによりホモ乳酸発酵によりDL-乳酸を生成し、

ガスの産生はない；

- 6) 各種炭水化物の分解性

グルコース；＋

ラクトース；＋

マンノース；＋

フラクトース；＋

ガラクトース；＋

シュクロース；－



マルトース；－  
キシロース；－  
ラムノース；－  
セルビオース；－  
トレハロース；－  
メルビオース；－  
ラフィノース；－  
スタキオース；－  
マンニトール；－  
ソルビトール；－  
ユースクリン；－  
サリシン；－。

- 2) 請求の範囲1に記載のラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌であって、ラクトバチルス・ヘルベチカスCM4株（工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号：FERM BP-6060）であるラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌。
- 3) 請求の範囲1に記載のラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌であって、制限酵素PstI及びEcoRIによって切断すると、15～17kbのDNA断片を生じる染色体DNAを有するラクトバチルス・ヘルベチカスに属する乳酸菌。
- 4) 請求の範囲1に記載の乳酸菌と、Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro及びこれらの混合物からなる群より選択されるトリペプチドとを含む発酵乳製品。
- 5) 前記発酵乳製品がDL-乳酸を含み、発酵乳製品が、DL-乳酸0.01gあたり前記トリペプチドをVal-Pro-Pro換算量で30～50μ

g 含む請求の範囲 4 に記載の発酵乳製品。

6) 前記請求の範囲 1 に記載の乳酸菌が生きた菌である請求の範囲 4 に記載の発酵乳製品。

7) 発酵乳製品が、ヨーグルト、乳清乳酸菌飲料、チーズ、酸乳配合の加工食品及び酸乳配合の健康食品からなる群より選択される請求の範囲 4 に記載の発酵乳製品。

8) Val-Pro-Pro 及び Ile-Pro-Pro を構成単位として含むペプチド、タンパク質及びこれらの混合物からなる群より選択される食品素材を含む培地を、請求の範囲 1 に記載の乳酸菌により発酵させる工程を含む請求の範囲 4 に記載の発酵乳製品の製造法。

9) 前記食品素材が、獣乳、乳カゼイン、トウモロコシ、コーン蛋白、小麦、小麦蛋白、大豆、豆乳、脱脂大豆、大豆蛋白及びこれらの混合物からなる群より選択される請求の範囲 8 に記載の製造法。

10) 前記発酵を、温度 25 ～ 50℃ で 6 ～ 60 時間行なう請求の範囲 8 に記載の製造法。

11) 前記発酵を、得られる発酵乳中に生産されるトリペプチド Val-Pro-Pro 及び Ile-Pro-Pro の量が Val-Pro-Pro 換算量で  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上となる条件で行なう請求の範囲 8 に記載の製造法。

BEST AVAILABLE COPY

1 / 1

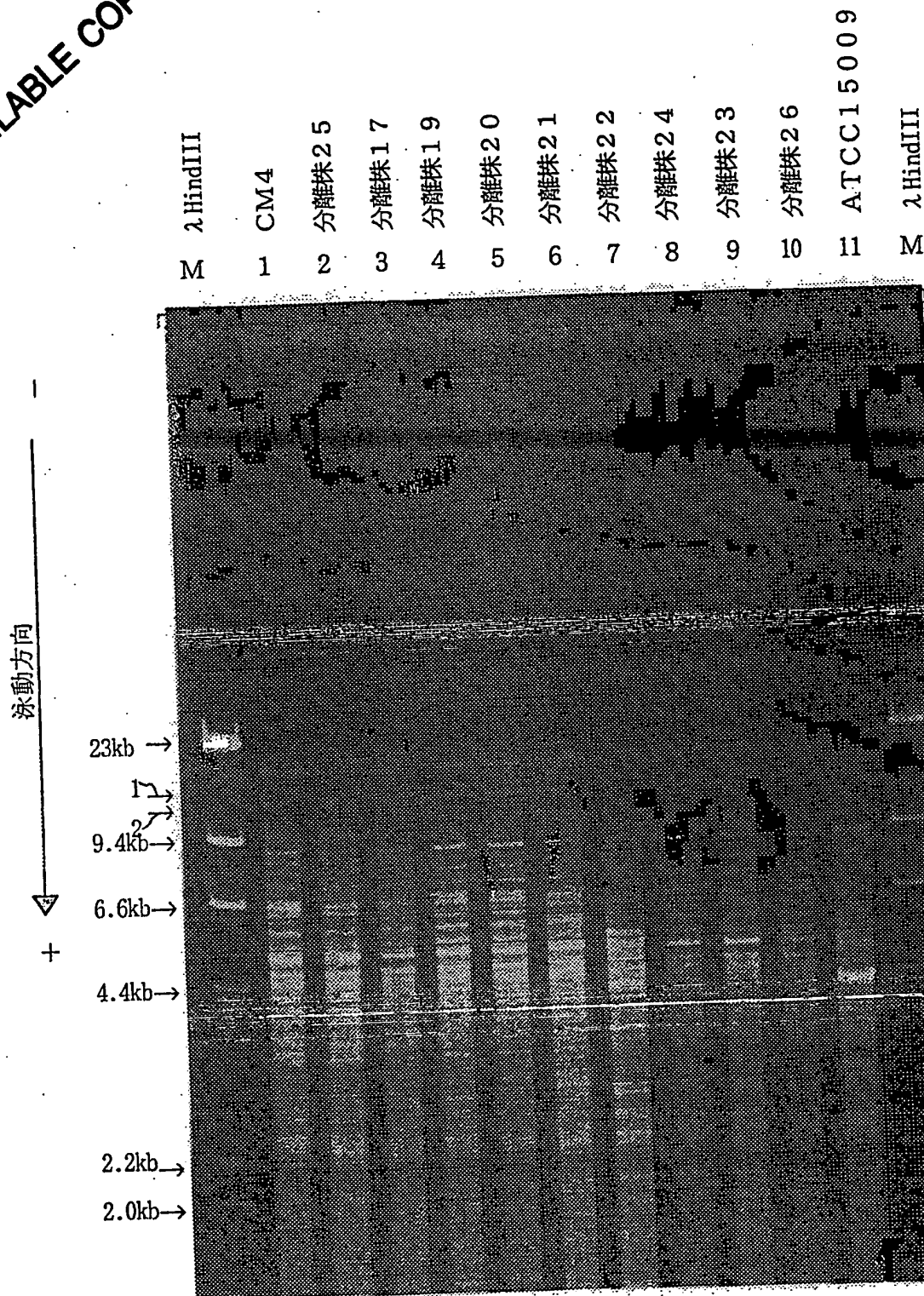


図 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/00481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N1/20, A23C9/123 // (C12N1/20, C12R1:225)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N1/20, A23C9/123

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-197786, A (The Calpis Food Industry Co., Ltd.), July 19, 1994 (19. 07. 94) (Family: none)	1-11
A	JP, 6-40944, A (The Calpis Food Industry Co., Ltd.), February 15, 1994 (15. 02. 94) & EP, 583074, A & US, 5449661, A	1-11
A	YASUNORI NAKAMURA ; NAUYUKI YAMAMOTO ; KUMI SAKAI ; AKIRA OKUBO ; SUNAO YAMAZAKI ; YOSHIKI TAKANO, Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk, Journal of Dairy Science, 1995, Vol. 78, No. 4, p.777-783	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
February 24, 1998 (24. 02. 98)

Date of mailing of the international search report  
March 3, 1998 (03. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/00481

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N1/20, A23C9/123 // (C12N1/20, C12R1:225)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N1/20, A23C9/123

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-197786, A (カルピス食品工業株式会社) 19. 7月. 1994 (19. 07. 94) (ファミリーなし)	1-11
A	JP, 6-40944, A (カルピス食品工業株式会社) 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) & EP, 583074, A & US, 5449661, A	1-11
A	YASUNORI NAKAMURA; NAOYUKI YAMAMOTO; KUMI SAKAI; AKIRA OKUBO; SU NAO YAMAZAKI; YOSHIKI TAKANO, Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk, Journal of Dairy Science, 1995, Vol. 78, No. 4, p. 777-783	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 02. 98

国際調査報告の発送日

03.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之



4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449